

ПАТТЕРНЫ МИТОЗОВ И АКТИВАЦИИ МАР-КИНАЗНОГО КАСКАДА
В ПЕРИОД РЕГЕНЕРАЦИИ ХВОСТА И В РЕФРАКТЕРНЫЙ ПЕРИОД
В РАЗВИТИИ ГОЛОВАСТИКОВ *XENOPUS LAEVIS*© 2018 г. А. С. Иванова^а, Г. В. Ермакова^а, А. Г. Зарайский^а, М. Б. Терёшина^{а, *}^аИнститут биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 117997 ГСП, Москва, В:437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: ma-treshka@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.12.2017 г.

Окончательный вариант получен 10.05.2018 г.

Были исследованы паттерны митозов и активации МАР-киназного каскада в процессе регенерации хвоста головастика африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* до и во время рефрактерного периода развития, когда утрачивается способность к регенерации. Известно, что головастики *Xenopus laevis* способны полностью восстанавливать полноценную структуру хвоста после ампутации. Однако в период рефрактерности (стадия 45–47) способность к регенерации значительно снижается, вплоть до полного ее отсутствия. Механизмы этого явления до сих пор остаются мало изученными. Нами был проведен сравнительный анализ среднего количества митотических клеток на 0–4 дни после ампутации в регенерирующих хвостах до периода рефрактерности и хвостах, ампутированных в рефрактерный период в развитии шпорцевой лягушки. Было показано значительное снижение количества митозов по всей поверхности хвоста в рефрактерный период, по сравнению с их резким увеличением в области бластемы хвоста, регенерирующего на ранних стадиях развития головастика. Кроме того, мы детектировали активацию МАР-киназного каскада (по интенсивности синтеза и распределения белка dpERK1/2 в тканях хвоста) в период регенерации и зафиксировали полное ингибирование МАР-киназного каскада в период рефрактерности. При этом, в дистальной части хвоста, ампутированного в рефрактерном периоде, не было зафиксировано активации экспрессии регенерационного маркерного гена *Fgf20a*. Таким образом, можно заключить, что блокирование регенеративной способности хвоста после ампутации у головастика в период рефрактерности сопровождается резким подавлением митотической активности клеток и нарушением активации Fgf-MAR-киназного каскада.

Ключевые слова: головастики шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, регенерация, рефрактерный период, МАР-киназный каскад, dpERK1/2, митозы, регенерационный маркер *Fgf20a*

DOI: 10.1134/S0475145018050026

Для бесхвостых амфибий характерен эпиморфный тип регенерации. Восстановление утраченных структур происходит за счет бластемы — массы мульти- и уни-потентных дедифференцированных клеток (Carlson, 2007; Stoick-Cooper et al., 2007). Известно, что головастики шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* способны восстанавливать хвост после ампутации в течение всего эмбрионального периода, начиная с момента формирования и роста хвоста (стадии 39–40 (Nieuwkoop, 1994)) вплоть до начала метаморфоза (60 стадия). При этом восстанавливаются все осевые структуры — нотохорд, спинной мозг, пигментные клетки, мышечные и эпителиальные ткани. Таким образом, можно удалить до 75% дистальной части хвоста без ущерба для животного, и хвост полностью восстановит свою полноценную структуру в течение 10–14 дней (Beck et al., 2006, 2009). Одна-

ко, в период между 45–47 стадиями, называемый рефрактерным, у головастика способность к регенерации резко блокируется (Beck et al., 2003). Изучение клеточных и молекулярно-генетических механизмов лежащих в основе такого резкого ингибирования регенерационных процессов имеет важное значение для понимания возможных способов модуляции регенеративной способности у млекопитающих. Несмотря на актуальность исследований, механизмы этого явления у головастика лягушек практически не изучены. Ранее было показано, что в период рефрактерности в развитии лягушки происходит ингибирование экспрессии транскрипционного фактора *Msx1*, регулируемого BMP сигнальным каскадом, и необходимого для дедифференцировки клеток (Beck et al., 2003). Также была продемонстрирована роль иммунной системы в реге-

нерации и изменения профиля экспрессии генов иммунного ответа в период рефрактерности (Fukazawa et al., 2009). Вероятно, все эти факторы оказывают существенное влияние на процесс формирования регенерационной бластемы, что является необходимым условием перехода от стадии заживления раны к регенерации. Интенсивное деление клеток и их дедифференцировка являются ключевыми этапами формирования бластемы и ее роста (Кнарр, Танака, 2012). Однако, в период рефрактерности регенерационная бластема не формируется, т.е. процессы активного деления и дедифференцировки клеток не происходят. В то же время, известно, что сигнальный путь с участием факторов роста фибробластов из семейства FGF, а также MAP-киназ (ERK1/2) — один из известных сигнальных путей, который регулирует пролиферацию, миграцию и дифференцировку практически всех типов клеток и активируется посредством малых ГТФаз (Orton et al., 2005; Kholodenko, Birtwistle, 2009).

Цель настоящей работы состояла в изучении изменений в распределении клеток в фазе митоза и активности участников общего сигнального каскада Fgf20, ERK1/2, регулирующего пролиферацию клеток, в регенерирующем хвосте головастика шпорцевой лягушки, и в не регенерирующем хвосте, ампутированном в рефрактерном периоде развития. В ходе работы мы получали эмбрионы африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* и дорастивали их до 39–40 стадии. Далее у головастика были ампутированы хвосты офтальмологическими микро-ножницами Ваннаса в условиях анестезии (MS222 (Sigma—Aldrich), 1 : 7000 в 0.1 MMR (Marc's Modified Ringer's)). Для получения серии образцов нормально регенерирующих хвостов (контрольные), часть головастика мы фиксировали сразу (0 дпа — день после ампутации) в растворе MEMFA (MOPS/EGTA/Magnesium Sulfate/Formaldehyde Buffer: 3.7% параформальдегид, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 mM MOPS, pH 7.4). Другую часть инкубировали в течение 1, 2, 3 и 4 дней, соответственно, и так же фиксировали в растворе MEMFA (рис. 1а). Для второй серии образцов (рефрактерных), полученные эмбрионы инкубировались до начала периода рефрактерности (стадии 45–46), и, по аналогии с предыдущим экспериментом, после ампутации хвостов головастики были зафиксированы с 0 по 4 дпа (рис. 1б). Головастики фиксировали около 1.5–2 ч при комнатной температуре, а затем отмывали: 3 раза в растворе 1× PBS по 5–10 мин, 3 раза в растворе PBT (1× PBS, 0.2% Tween 20) по 10 мин, и затем инкубировали в растворе с блокирующим реагентом (10% сыворотка новорожденных телят (Sigma cat. # N4762) в PBT) в течение 60 мин.

Далее мы провели серию иммуногистохимических окрашиваний, с использованием первичных

кроличьих антител к фосфорилированному гистону pH3 (Millipore, cat. # DAM1545035, 1 : 100), являющимся маркером митоза (Hendzel et al. 1997). В качестве вторичных антител использовали анти-кроличьи антитела, конъюгированные с зеленым флуоресцентным белком CF 488 (Sigma, cat. # SAB4600234, 1 : 500). Было показано, что в контрольной группе головастика средняя плотность митозов в проксимальной части хвоста (проксимальнее уровня ампутации) была одинаковой с 0 по 4 дпа (рис. 1в', г'). В то же время, в области регенерирующего хвоста было отмечено существенное увеличение числа митотических клеток (рис. 1ж). В группе головастика, у которых хвост был ампутирован во время рефрактерного периода, напротив, было отмечено значительное снижение плотности митозов по всей поверхности хвоста, в том числе по краю области ампутации хвоста (рис. 1д', 1е', 1ж).

Одним из хорошо изученных сигнальных путей, регулирующих митотическую активность клеток, является FGF-MAP-киназный каскад (Lovicu, McAvoy, 2001). Мы проанализировали активацию MAP-каскада, а именно паттерн активации его ключевого компонента — протеинкиназы ERK1/2, в течение 0–4 дпа в ходе эпиморфной регенерации хвоста и в рефрактерном периоде, когда регенерация невозможна. Для исследования были использованы первичные мышинные антитела к дефосфорилированной протеинкиназе ERK1/2 (dpERK 1/2) (Sigma, cat. # M9692, 1 : 200). В качестве вторичных антител мы использовали анти-мышинные антитела, конъюгированные с красным флуоресцентным белком CF568 (Sigma, cat. # SAB4600425, 1 : 500). Иммуногистохимическое окрашивание показало, что спустя сутки после ампутации хвоста головастика на стадии 40–42 ERK1/2-киназный каскад активируется в раневом эпителии, нотохорде и мезенхиме хвостовых плавников (рис. 1в''). Далее, к моменту формирования бластемы (2–3 дпа), ERK1/2-киназный каскад активируется в клетках бластемы и регенерирующем нотохорде (рис. 1г''). Полученные данные показывают, что на ранних этапах развития при регенерации хвоста у головастика происходит активация MAP-киназного каскада, опосредованного протеинкиназой ERK1/2. В период рефрактерности в развитии, напротив, происходит существенное ингибирование экспрессии ERK1/2 по всей площади хвоста (рис. 1д'', 1е'').

Среди сигнальных факторов, активирующих ERK1/2-киназный путь для передачи сигнала в клетку, важная роль принадлежит факторам роста фибробластов (FGF) (Meloche, Pouysseur, 2007). FGF-сигнальный каскад вовлечен в процесс заживления ран у млекопитающих, регенерацию хвоста, конечностей и скелетной мускулатуры низших позвоночных, а также участвует в

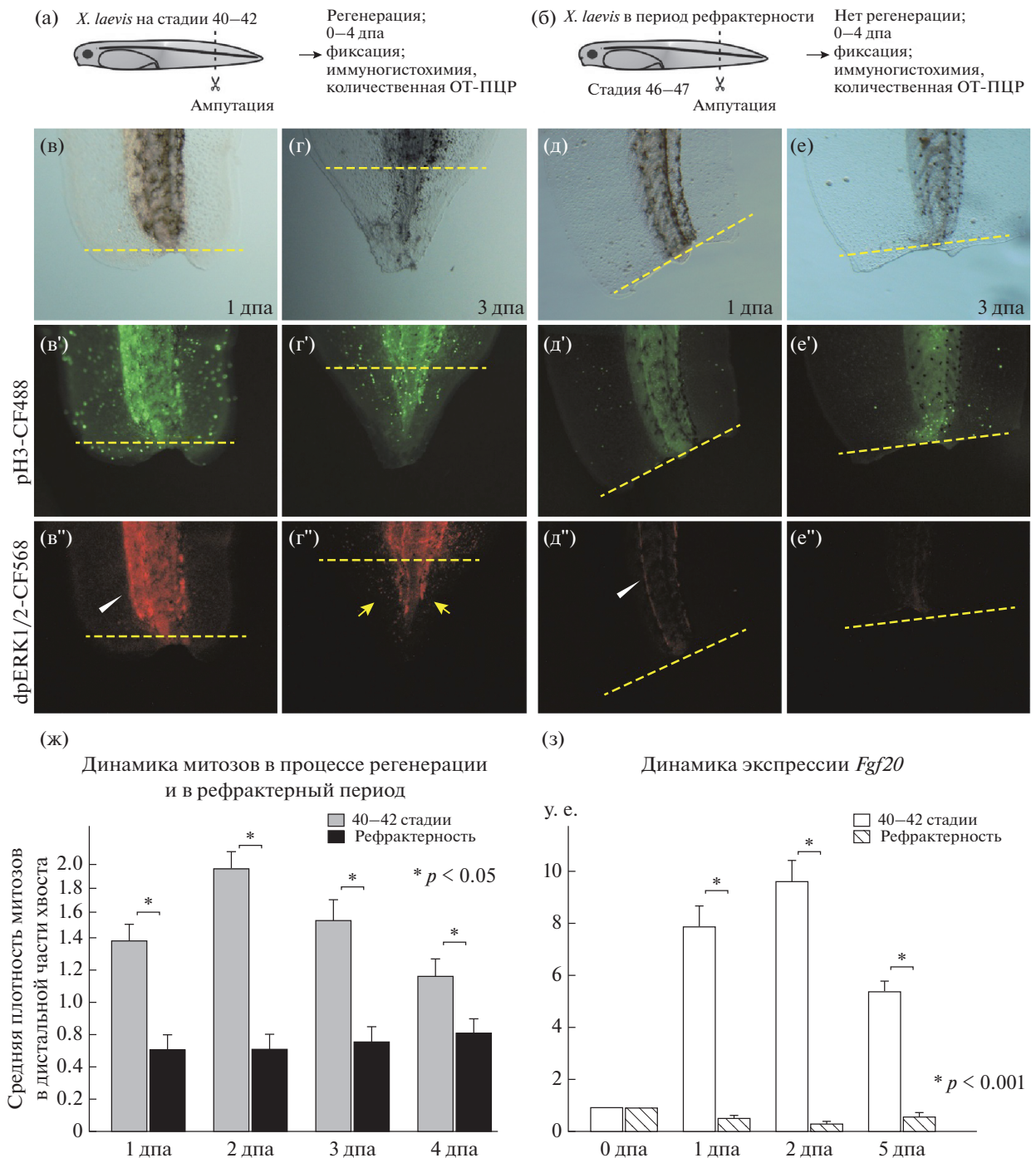


Рис. 1. Динамика распределения пролиферирующих клеток, клеток с активацией ERK1/2-каскада и экспрессии *Fgf20* в ходе регенерации хвоста *Xenopus laevis*, ампутированного на стадии 40–42 и в хвосте в рефрактерный период развития. (а, б) Схемы экспериментов. (в–е) Фотографии хвостов головастика на 1 и 3 дни после ампутации на ст. 40–42 (в, г) и в рефрактерный период развития (ст. 45–47) (д, е). Желтая пунктирная линия указывает линию ампутации. Дорсальная сторона справа. (в'–е') и (в'–е'') Флуоресцентные фотографии головастика на 1 и 3 дни после ампутации на ст. 40–42 (в, г) и в рефрактерный период (ст. 45–47) после иммуногистохимического окрашивания митотических клеток (pH3-CF488) и активации ERK1/2 каскада (pERK1/2-CF568) в тканях хвоста, соответственно. На (в', г') видна активная пролиферация клеток (зеленые клетки) в хвосте до и после зоны ампутации. Однако, в рефрактерный период развития пролиферативная активность сильно ингибирована (д', е'). Базовая активация ERK1/2 в клетках хвоста (мышечных, хордовых и др.) на стадии регенерации (в'') и в ее рефрактерный период (д'') сильно различается (белые стрелки). Желтые стрелки указывают на флуоресцентные клетки с активированным каскадом ERK1/2 в восстановленной части хвоста, в клетках бластемы. (ж) Изменения плотности митотических клеток в хвосте головастика в ходе регенерации (1–4 дпа) и в рефрактерный период развития. Количество хвостов, используемых для анализа, в каждой временной точке составляло 7, было проведено 3–4 независимых эксперимента. t – критерий Стьюдента, $p < 0.05$ (звездочка). Дпа – дней после ампутации. (з) Анализ изменений уровня экспрессии маркерного гена регенерации – *Fgf20a*, методом количественной ОТ-ПЦР с 0-й по 5-й дпа у головастика в ходе регенерации и в рефрактерном периоде развития. t – критерий Стьюдента, $p < 0.001$ (звездочка). Дпа – дней после ампутации, у.е. – условные единицы.

эмбриональном развитии сердца и ангиогенезе (Gospodarowicz, 1976). Ранее была показана необходимость активации FGF-сигнального пути для полноценной регенерации хвоста головастики *Xenopus laevis* (Lin, Slack, 2008). Логично было предположить, что наблюдаемое отсутствие активации ERK1/2 в рефрактерных ампутированных хвостах может быть связано с отсутствием определенных сигнальных факторов. Среди множества описанных факторов из семейства FGF, уровень экспрессии факторам роста фибробластов 20 (Fgf20) наиболее возрастает в ответ на ампутацию хвоста у головастика на стадии 40–42 (Beck et al., 2006). Мы провели анализ динамики экспрессии гена Fgf20 в ходе эпиморфной регенерации хвоста и в период утраты этой способности в развитии шпорцевой лягушки, с использованием метода количественной ОТ-ПЦР. В результате мы показали, что в период рефрактерности в развитии, не происходит увеличения количества транскриптов гена Fgf20 в тканях хвоста на 1 и 2 дни после его ампутации, по сравнению с эпиморфной регенерацией хвоста на тех стадиях эмбрионального развития, которые предшествуют периоду рефрактерности. Соответственно, можно предположить, что значительное снижение способности к регенерации в это период, связано с подавлением механизмов, использующих Fgf-сигнальный каскад.

В итоге можно заключить, что в рефрактерный период развития ксенопуса процесс регенерации сильно нарушается: происходит массовое подавление пролиферации клеток, ингибирование сигнальных каскадов с участием Fgf20 и ERK1/2-киназы, регулирующих митотическую активность, миграцию и дифференцировку клеток. Можно предположить, что данные процессы необходимы для обеспечения ресурсами формирующихся органов пищеварительного тракта, претерпевающего перестройку в этот период развития головастика, в связи с переходом животных от “эндопитания” (запасами материнского желтка) к “экзопитанию” (самостоятельно добытой пищей) (McKeown et al., 2017).

Кроме того, обнаруженное ингибирование митозов и Fgf-МАРК-каскада может быть связано с началом процесса формирования иммунной системы головастика. Как было показано, ингибирование экспрессии иммунных маркеров в рефрактерный период развития головастика, способствует пролонгированию способности к регенерации хвоста (Fukazawa et al., 2009), что, вероятно, сопровождается активацией сигнальных каскадов, стимулирующих пролиферацию клеток.

Дальнейший поиск ключевых регуляторов регенерационной способности в ходе ее рефрактерного периода и возможностей модуляции их

активностью представляют перспективу для разработки способов активации процессов регенерации у позвоночных со сниженным регенерационным потенциалом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Эксперименты по исследованию Fgf-ERK-киназного каскада были выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-14-00-557). Эксперименты по изучению паттернов митотической активности при нормальной регенерации были выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-04-01524а, в период рефрактерности — из средств гранта А.С. Ивановой по программе Сколтеха по поддержке молодых ученых в области системной биологии “Research Fellowships in System Biology”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Beck C.W., Izpisua Belmonte J.C., Christen B. Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms // *Developmental Dynamics*. 2009. Jun. 238(6): 1226–1248. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.21890>.
- Beck C.W., Christen B., Barker D., Slack J.M. Temporal requirement for bone morphogenetic proteins in regeneration of the tail and limb of *Xenopus tadpoles* // *Mechanisms of Development*. 2006. Sep. 123(9): 674–688.
- Beck C.W., Christen B., Slack J.M. Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a Vertebrate // *Developmental Cell*. 2003. Sep. 5(3): 429–439.
- Carlson B. Chapter 1 — an introduction to regeneration // *Principles of Regenerative Biology*. 2007. 1–29.
- Fukazawa T., Naora Y., Kunieda T., Kubo T. Suppression of the immune response potentiates tadpole tail regeneration during the refractory period // *Development*. 2009. Jul. 136(14): 2323–2327. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.033985>.
- Gospodarowicz D. Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing, and neoplastic growth // *Prog. Clin. Biol. Res.* 1976. 9: 1–19.
- Hendzel M.J., Wei Y., Mancini M.A., Van Hooser A., Ranalli T., Brinkley B.R., Bazett-Jones D.P., Allis C.D. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation // *Chromosoma*. 1997. Nov. 106(6): 348–360.
- Kholodenko B.N., Birtwistle M.R. Four-dimensional dynamics of MAPK information-processing systems // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2009. Jul–Aug. 1 (1): 28–44. <http://dx.doi.org/10.1002/wsbm.16>.
- Knapp D., Tanaka E.M. Regeneration and reprogramming // *Current Opinion in Genetics and Development*. 2012. Oct. 22(5): 485–493. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2012.09.006>.

- Lin G., Slack J.M. Requirement for Wnt and FGF signaling in *Xenopus* tadpole tail regeneration // Developmental Biology. 2008. Apr 15. 316(2): 323–335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.01.032>.
- Lovicu F.J., McAvoy J.W. FGF-induced lens cell proliferation and differentiation is dependent on MAPK (ERK 1/2) signalling // Development. 2001. Dec. 128(24): 5075–5084.
- McKeown C.R., Thompson C.K., Cline H.T. Reversible developmental stasis in response to nutrient availability in the *Xenopus laevis* central nervous system // The Journal of Experimental Biology. 2017. Feb 1. 220(Pt 3): 358–368. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.151043>.
- Meloche S., Pouysseur J. The ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1-to S-phase transition // Oncogene 2007 May 14; 26(22): 3227–3239.
- Nieuwkoop P.B., Faber J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin): A Systematical & Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. New York: Garland Pub., 1994.
- Orton R.J., Sturm O.E., Vyshemirsky V., Calder M., Gilbert D.R., Kolch W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway // Biochemical J. 2005. Dec 1. 392(2): 249–261. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20050908>.
- Stoick-Cooper C.L., Moon R.T., Weidinger G. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine // Genes and Development. 2007. Jun. 21(11): 1292–1315.

Patterns of Mitosis and Activation of the MAP-Kinase Cascade during Tadpoles Tail Regeneration in Refractory Period of *Xenopus laevis* Development

A. S. Ivanova¹, G. V. Ermakova¹, A. G. Zarskiy¹, and M. B. Tereshina¹ *

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: ma-treshka@yandex.ru

Received December 11, 2017; in final form, May 10, 2018

Patterns of mitotic cells distribution and activation of the MAP-kinase cascade during the regeneration of the *Xenopus laevis* tadpoles tails were studied before and during the refractory period. It is known that the tadpoles of *Xenopus laevis* are able to fully restore the full structure of the tail after amputation. However, in the refractory period (stage 45–47), the ability to regenerate is significantly reduced, until its complete absence. The mechanisms of this phenomenon are still poorly understood. We conducted a comparative analysis of the average number of mitotic cells at 0–4 days post amputation in normally regenerating tails and in tails amputated during the refractory period. It was shown a significant decrease in the number of proliferating cells throughout the surface of the tail in the refractory period, compared with their sharp increase in the blastema area in normally regenerating tadpoles. In addition, we detected activation of the MAP-kinase cascade (dpERK1/2) during normal regeneration and demonstrated its full inhibition during the refractory period. At the same time, in the distal part of the tail, amputated in the refractory period, activation of the expression of the regenerative marker gene *Fgf20* was not detected. Thus, we can conclude that the blocking of the regenerative capacity in tadpoles during the refractory period is accompanied by a sharp suppression of the mitotic activity of the cells and a misregulation of the activation of the Fgf-MAP-kinase cascade in the tail after amputation.

Keywords: tadpoles of *Xenopus laevis*, regeneration, refractory period, MAP-kinase cascade, dpERK1/2, mitoses, regenerative marker gene *Fgf20*